

AQ

(19)



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



(11) Veröffentlichungsnummer: **0 613 685 A1**

(12)

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 94102340.0

(51) Int. Cl.<sup>5</sup>: **A61K 9/127, A61K 31/155,  
A61K 7/00, A61K 7/22**

(22) Anmeldetag: 16.02.94

(30) Priorität: 02.03.93 DE 4306475

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
07.09.94 Patentblatt 94/36

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
**AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU MC  
NL PT SE**

(71) Anmelder: Gonzalez Ensenat, Pedro  
Calvet 47

E-08021 Barcelona (ES)

Anmelder: Maierhofer, Günther

Stöcklstrasse 5A

D-81247 München (DE)

Anmelder: Olivé Moncho, Jorge

Mayor de Sarria 139

E-08017 Barcelona (ES)

Anmelder: Echeverria Garcia, José Javier

Valls i Taberner 13

E-08006 Barcelona (ES)

(72) Erfinder: Gonzalez Ensenat, Pedro  
Calvet 47

E-08021 Barcelona (ES)

Erfinder: Maierhofer, Günther

Stöcklstrasse 5A

D-81247 München (DE)

Erfinder: Olivé Moncho, Jorge

Mayor de Sarria 139

E-08017 Barcelona (ES)

Erfinder: Echeverria Garcia, José Javier

Valls i Taberner 13

E-08006 Barcelona (ES)

(74) Vertreter: Patentanwälte Grünecker,  
Kinkeldey, Stockmair & Partner  
Maximilianstrasse 58  
D-80538 München (DE)

(54) **Liposomen, enthaltend Chlorhexidindiacetat oder Chlorhexidingluconat.**

(57) Es werden Liposomen beschrieben, die Chlorhexidindiacetat oder Chlorhexidindigluconat verkapselt enthalten und deren Zusammensetzung neben Doppelschicht bildenden Lipiden zusätzlich Tenside umfaßt.

Als Vorteile gegenüber der freien Form des Chlorhexidins können bei der liposomalen Darbietung die höhere und längere Wirksamkeit sowie geringere Nebenwirkungen angeführt werden.

EP 0 613 685 A1

Die Erfindung betrifft Liposom n, die zur speziellen Anwendung von Chlorhexidin für Desinfektion und medizinische Zwecke dienen.

Die Häufung bakterieller Plaques auf der Zahnoberfläche oder im Zahnfleischgewebe ist der hauptsächlich ätiologische Faktor für beginnenden Zahnverfall, Zahnfleischentzündung und Wurzelhautentzündung. In all diesen Fällen besteht die Vorsorge in erster Linie in der täglichen häuslichen Mundhygiene, d. h. Zähneputzen und Reinigung der Zahnzwischenräume, sowie in regelmäßigen zahnärztlichen Behandlungen, bei denen bakterielle Plaques und Zahnstein meist mit Hilfe von Schleifmaterialien entfernt werden. Obwohl diese Therapie- und Vorsorgemaßnahmen bei korrekter Durchführung durchaus wirkungsvoll sein können, sind sie doch in mancher Hinsicht beschränkt. So muß die häusliche Mundhygiene regelmäßig und sorgfältig erfolgen. Die Entfernung von Plaques aus den Zahnzwischenräumen erfordert manuelle Geschicklichkeit, die beispielsweise Kinder, ältere Menschen oder Behinderte nicht besitzen. Wie regelmäßig eine Zahnreinigung erfolgt, hängt außerdem stark von Motivation und Erziehung ab. Von noch größerer Bedeutung ist es jedoch, daß die vollständige Entfernung von bakteriellen Plaques und Zahnstein in fortgeschrittenen Fällen von Wurzelgabelung und Zahnfleischtaschen (mit einer Tiefe von mehr als 4 bis 5 mm vom Zahnfleischrand bis zum Grund des Defekts) extreme Schwierigkeiten bereitet. Dies ist selbst dann der Fall, wenn man eine Eingriff durchführt, um einen Zugang für die Reinigung zu erhalten. In vielen Fällen versagt die Behandlung von Periodontitis daher, weil es nicht gelingt, Zahnstein und verunreinigten Wurzelzement aus dem betroffenen Bereich während der Behandlung vollständig zu entfernen, oder weil der Patient nicht in der Lage ist, die Anzahl der bakteriellen Plaques während der Pflegephase unterhalb einer kritischen Grenze zu halten.

Auch die bisher wirkungsvollste chemische Methode, um die Bildung bakterieller Plaques zu verhindern, nämlich die Verwendung von Chlorhexidin als 1,2 bis 2 %ige Lösung zur zweimaligen täglichen Mundspülung von jeweils 2 Minuten, weist Nachteile auf. Besonders bei Rauchern, Tee- oder Kaffeetrinkern führt diese Methode zu Zahnverfärbungen, die einer täglichen Anwendung entgegenstehen. Zu den weiteren Ursachen der Zahnverfärbung gehören außerdem die Nekrose der Zahnpulpa, endodontische Zahnbehandlungen und die Alterung der Zähne, wobei es in letzterem Fall auch eine Rolle spielt, ob Abbaupartikel von bakteriellen Plaques (gefärbt beispielsweise durch Rauch, Nahrungsmittel oder Getränke) in die äußere Schicht des Zahnschmelzes eingebaut werden. Die relativ weit verbreitete Zahnverfärbung verursacht durch Chlorhexidin ist dosisabhängig. Auch wenn bei der Anwen-

dung einer 0,21 %igen Chlorhexidinlösung, verglichen mit einer 2 %igen, keine so drastische Verfärbung der Zähne auftritt, so bleibt sie doch ein großes, bisher ungelöstes Problem.

Andere Nebenwirkungen von Chlorhexidin, angewandt in der Mundhöhle, sind Geschmacksbeeinträchtigung, exfoliative Irritation der Mundschleimhaut (eine Folge der Alkoholkomponente in der Chlorhexidinlösung, meist 10 % Alkohol) und eine erleichterte Zahnsteinbildung.

Diese Nebenwirkungen schränken den Einsatz von Chlorhexidin stark ein und haben die Suche nach Alternativen stimuliert. Bis heute ist es nicht gelungen, einen anderen Wirkstoff zu finden, der dasselbe Wirkungsspektrum auf die Plaqueinhibierung und die Beseitigung von Plaque hat. Desgleichen ist bisher vergeblich versucht worden, Chlorhexidin haltige Formulierungen so zu verändern, daß keine Nebenwirkungen auftreten.

Die Lösung des Problems wurde erfindungsgemäß dadurch erreicht, daß Chlorhexidin in Liposomen entsprechend der Zusammensetzung in Anspruch 1 verkapselt werden. Spezielle Ausführungen werden durch die Unteransprüche wiedergegeben.

Unter Liposomen werden hier kugelförmige Vesikel aus einer oder mehreren Lipiddoppelschichten mit einem wässrigen Innenraum verstanden. Überraschend wurde festgestellt, daß sich Chlorhexidin in Liposomen, die neben den Doppelschicht bildenden Lipiden zusätzliche Tenside enthalten, stabil verkapseln läßt. Derartig liposomal verkapseltes Chlorhexidin kann nicht nur mit höherer Effizienz sondern auch mit lang andauernder Wirkung eingesetzt werden.

Zur Herstellung der Liposomen sind Doppelschicht bildende Membrankomponenten erforderlich, also amphiphile Substanzen wie Lipide oder Lipoide, d. h. Substanzen mit polaren, hydrophilen Kopfgruppen und unpolaren lipophilen Resten, wie sie für die Liposomenbildung üblicherweise verwendet werden. Zweckmäßig werden vorzugsweise physiologisch verträgliche, natürliche Lipide, wie Steroide, Phospholipide, Sphingolipide und Glykolipide verwendet. Bevorzugte Verbindungen umfassen Cerebroside und Ceramide, natürliche Phosphocholine, Phosphatidsäuren oder Phosphatidylglycerole, sowie gegebenenfalls Lysophospholipide und Fettsäuren und deren Derivate.

Erfindungsgemäß wurde festgestellt, daß die Chlorhexidin-Liposomen besonders rasch in die Haut und Schleimhaut penetrieren und besonders gut auf Zellen in vivo wirken, wenn den Lipiden, welche die Liposomenmembran bilden, zusätzlich Tenside zugesetzt werden. Die Art der zuzusetzen den Tenside hängt von ihrer physiologischen Verträglichkeit ab. Vorzugsweise werden Substanzen biologischer Herkunft eingesetzt, z. B. Gallensäuren und ihre Derivate, Glukoside, Maltoside und

Thioglukoside sowie Lysophospholipide. Besonders bevorzugte Verbindungen sind Natriumcholat, Natriumdesoxycholat, Natriumglykocholat, Natriumtaurocholat, aber auch Polyoxyethylene, Brij 56 und Brij 76, sowie Tween 80. Lipid (L) und Tensid (D) werden zweckmäßig in einem Molverhältnis L/D von 0,5 bis 40 eingesetzt, vorzugsweise 2 bis 20, besonders bevorzugt 3,1 bis 5,5.

Erfindungsgemäß werden die Liposomen hergestellt, indem man die lipiden Membrankomponenten und Chlorhexidin entweder als solche oder gelöst in einer geringen Menge eines physiologisch verträglichen, mit Wasser mischbaren Lösungsmittels, z. B. Alkohol, mit einer wässrigen Lösung der Tenside kombiniert. Die wässrige Lösung kann außerdem beispielsweise Salze, wasserlösliche Wirkstoffe oder Puffersubstanzen enthalten. Gegebenenfalls können weitere für die Liposomenherstellung übliche Zusatz- und Hilfsstoffe wie Gelbildner, Membranstabilisatoren und Konservierungsstoffe, z. B. Antioxydantien, sowie Oligopeptide und Proteine eingesetzt werden, die dem System zu jedem beliebigen Zeitpunkt entweder zusammen mit Lipiden und Tensiden oder aber getrennt von ihnen zugeführt werden können.

Die Vesikelbildung erfolgt durch Störung des Systems, indem man der heterogenen Mischung aus Lipiden und Tensiden mechanische Energie zuführt. Dies kann z. B. durch Schütteln, Rühren oder durch andersartige Einwirkung von Scherkräften, z. B. durch Filtrieren, erfolgen. Bevorzugt wird eine Störung des Systems mit Hilfe einmaliger Filtration. Man arbeitet hierbei vorzugsweise bei einem geringen Überdruck von 1 bis 6 bar. Der Porendurchmesser der Filter liegt zweckmäßig zwischen 0,1 und 0,8  $\mu\text{m}$ , vorzugsweise zwischen 0,15 und 0,3  $\mu\text{m}$ . Soll die Liposomenpräparation steril erhalten werden, so beträgt die obere Grenze des Porendurchmessers 0,22  $\mu\text{m}$ . Die Herstellungstemperatur wird der Nutz- und Trägerstoffwahl angepaßt und liegt zweckmäßig zwischen 0 und 95 °C. Vorzugsweise arbeitet man in einem Temperaturbereich von 18 bis 70 °C; besonders bevorzugt für die Lipide mit fluiden Ketten ist der Temperaturbereich zwischen 18 und 38 °C, für die Lipide mit geordneten Ketten zwischen 45 und 60 °C.

Der pH-Wert liegt zweckmäßig in einem Bereich von 1 bis 10. Vorzugsweise wird im pH-Bereich zwischen 4 und 8, besonders bevorzugt zwischen 5 und 6,5 gearbeitet.

Als Ergebnis einer derartigen Präparationsmethode erhält man überwiegend unilamellare Liposomen.

Der Anteil des zu verkapselnden Chlorhexidins ist abhängig vom jeweiligen Anwendungsgebiet und der Löslichkeit des Chlorhexidins. Zweckmäßig liegt die Chlorhexidinkonzentration zwischen 0,01 und 3 %, die der Membranbildner zwischen 0,5 und 10 %.

Die Verkapslung von Chlorhexidin in Liposomen führt zu einer signifikanten Dosisreduktion bei gleicher Wirksamkeit, verglichen mit der freien Form. Nebenwirkungen, wie z. B. die Zahnverfärbung, werden stark reduziert oder treten erst gar nicht auf.

Neben der Beseitigung und zur Vorbeugung von bakterieller Plaquebildung können die erfindungsgemäßen Chlorhexidin-Liposomen auch bei der chemischen Wundbehandlung von Zahnfleischartaschen, bei der Behandlung periodisch auftretender aphtöser Mundschleimhautentzündung, zur periapikalen bakteriellen Dekontamination von Wurzelkanälen bei der endodontischen Therapie, bei Candida-Mykosen an Mund- und Zungenschleimhaut, bei den verschiedenen Formen der Gingivitis und der gingivalen Hyperplasie und bei der bakteriellen Desinfektion epidermaler, mesodermaler und mukosaler Gewebe verwendet werden. Die Anwendung von liposomalem Chlorhexidin ist jedoch nicht auf den Bereich der Zahnmedizin oder der Mundhygiene beschränkt, sondern erstreckt sich auch auf andere medizinische Gebiete, wie z. B. der Wunddesinfektion, präoperative Hautdesinfektion, Augen-, Blasen-, Pleural- und Peritoneal-Spülungen und das Imprägnieren von Gazetupfern.

Mit der erfindungsgemäßen Liposomenpräparation wird demnach ein Mittel zur Verfügung gestellt, das nicht nur eine stabile sondern auch eine wirkungsvollere Anwendungsform von Chlorhexidin darstellt. Weitere Vorteile sind, daß das Verfahren einfach anzuwenden ist und die Chlorhexidinliposomen ausgezeichnet gewebeverträglich sind.

### Beispiel

1 g Chlorhexidindiacetat bzw. Chlorhexidindigluconat und 4 g Sojalecithin werden in 4 ml Ethanol gelöst. 0,04 g Kochsalz und 0,56 g Natriumcholat werden in 43 ml Wasser bidest. gelöst. Beide Lösungen werden innig vermischt und die heterogene Mischung bei 5 bar sterilfiltriert. Die resultierende Liposomendispersion wird auf den gewünschten pH-Wert eingestellt und auf die in der nachfolgend geschilderten vorläufigen klinischen Cross over-Studie eingesetzte Chlorhexidinkonzentration verdünnt.

In der Studie wurde liposomales Chlorhexidin mit einer Chlorhexidinkonzentration von 0,05 % (LC) gegen ein handelsübliches Chlorhexidinprodukt mit einer Chlorhexidinkonzentration von 0,12 % (CC) getestet. Eine dritte Gruppe in der Studie wurde mit NaF-Lösung als Placebo behandelt (F).

An dieser Studie nahmen 7 Frauen teil, 21 bis 39 Jahre alt, jede mit mindestens 22 Zähnen, medizinisch gesund und ohne Zahnverfall, Gingivitis oder Periodontitis. Die Studie wurde eingeteilt in 3 Abschnitte von jeweils 4 Tagen. Für jeden Zeitab-

schnitt wurde folgendes Protokoll durchgeführt:

Nach sorgfältiger, professioneller Plaque-Entfernung, also Beginn mit einem Plaqueindex von Null (gemäß Silness Loe Klassifizierung), wurden die Teilnehmer gebeten, mit dem Zahnputzen aufzuhören und statt dessen Mundspülungen, 2 mal täglich 2 Minuten mit 10 ml einer der drei Lösungen durchzuführen und das über einen Zeitraum von 4 Tagen. Am Ende dieses Zeitabschnitts wurde ein Plaquedetektor (Trace, Loric) benutzt und ein bakterieller Plaqueindex für die 12 Vorderzähne bei jedem Teilnehmer bestimmt. Danach wurde den Teilnehmern gestattet, ihr gewohntes Zahnputzen für die folgenden 2 1/2 Tage wieder aufzunehmen, bevor eine neue 4 Tage-Testperiode mit einer der anderen Lösungen begonnen wurde.

Die erhaltenen Daten bezüglich der Plaqueindizes wurden an der Abteilung für Statistik der Universität Barcelona ausgewertet, wobei der Kruskal-Wallis Test für die Varianz herangezogen wurde. Die Ergebnisse zeigen einen signifikanten Unterschied zwischen CC und F, ebenso zwischen LC und F (in beiden Fällen Signifikanzlevel = 0,00001). Der Vergleich zwischen CC und LC zeigte keine Unterschiede (Signifikanzlevel = 0,0995). Statistisch signifikante Unterschiede wurden zwischen den Chlorhexidinlösungen und dem Placebo gefunden, wenn alle 3 Testlösungen zusammen ausgewertet wurden (Signifikanzlevel = 0,00001).

Während der Dauer der Studie wurden mit den Chlorhexidin-Liposomen keine Nebenwirkungen beobachtet, wie sie im Allgemeinen mit handelsüblichem Chlorhexidin bemerkt werden.

Basierend auf dem gegenwärtigen Wissensstand über Liposomen als Arzneistoffträger erscheint es vernünftig, sowohl eine substantielle Verbesserung als auch eine stark verbesserte Penetrationseffizienz von liposomalem Chlorhexidin zu erwarten, verglichen mit der freien Form des Chlorhexidins.

#### Patentansprüche

1. Liposomen, dadurch gekennzeichnet, daß sie Chlorhexidindiacetat oder Chlorhexidindigluconat verkapselt enthalten und ihre Zusammensetzung neben Doppelschicht bildenden Lipiden zusätzlich Tenside umfaßt.
2. Liposomen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Lipide und/oder Tenside physiologisch verträgliche Verbindungen, bevorzugt natürlichen Ursprungs, sind.
3. Liposomen nach einem der Ansprüche 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Lipide ausgewählt sind aus der Gruppe der Phospholipide, Sphingolipide und Glykolipide.

4. Liposomen nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Tenside ausgewählt sind aus der Gruppe der Gallensäuren und ihrer Derivate, sowie deren physiologisch verträglichen Salzen.

5. Liposomen nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Tenside ausgewählt sind aus Natriumcholat, Natriumdeoxycholat, Natriumglykocholat, Natriumtaurocholat oder Natriumtaurodeoxycholat.

6. Liposomen nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das molare Verhältnis von Lipiden (L) zu Tensiden (D) 0,5 bis 40, vorzugsweise 2 bis 20, besonders bevorzugt 3,1 bis 5,5 beträgt.

7. Liposomen nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß sie zusätzlich mindestens einen der üblichen Hilfs- und Zusatzstoffe, vorzugsweise Gelbildner und Membranstabilisatoren, umfassen.

8. Liposomen nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Doppelschicht bildenden Lipide und Chlorhexidin entweder als solche oder gelöst in einer geringen Menge eines mit Wasser mischbaren und zweckmäßig physiologisch verträglichen Lösungsmittels mit einer wässrigen Lösung von Tensiden kombiniert werden und die Liposomenbildung in der erhaltenen heterogenen Mischung durch Zufuhr mechanischer Energie, insbesondere durch Schütteln, Rühren oder Filtrieren, eingeleitet wird.



Europäisches  
Patentamt

# EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung  
EP 94 10 2340

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.5)
X	WO-A-92 20319 (L' ORÉAL)	1-3,6,7	A61K9/127
Y	* das ganze Dokument * ---	4,5,8	A61K31/155
Y	EP-A-0 475 160 (CEVC) * Seite 4, Zeile 46 - Seite 5, Zeile 26 * * Seite 9, Zeile 38 - Seite 10, Zeile 5 * * Seite 17, Zeile 34 - Zeile 35 * * Seite 38 - Seite 40; Beispiele 62-107 * * Seite 44 - Seite 47; Beispiele 151-175 * * Seite 49 - Seite 52; Beispiele 236-237 * * Seite 53 - Seite 54; Beispiel 243 * * Ansprüche 1-10 * ---	4,5	A61K7/00 A61K7/22
Y	EP-A-0 509 338 (MERZ & CO. GMBH & CO.) * Seite 6 - Seite 7; Beispiele 1-3 * ---	8	
A	DATABASE WPI Week 8827, Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 88-188027 & JP-A-63 126 820 (SHISEIDO KK) 30. Mai 1988 * Zusammenfassung * -----	1-8	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.5)
			A61K
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 8. Juni 1994	Prüfer Benz, K
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE			
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	